

Carcinoma colon-rettale: espianto tissutale e colture primarie



Ann. Ital. Chir., 2009; 80: 211-217

Roberto Spisni*, Alessandra Failli**, Giulia Orsini**, Olga Kastsuchenka***, Gianfranco Natale***, Maura Castagna****, Annalisa Legitimo**, Alekandr Aghasbalyan*, Carlo Enrico Ambrosini*, Rita Consolini*, Paolo Miccoli*

Università di Pisa, Italia

*Dipartimento di Chirurgia, Università di Pisa, Italia

**Dipartimento di Medicina della Procreazione e dell'Età Evolutiva; Laboratorio di Immunologia, Università di Pisa, Italia

***Dipartimento di Morfologia Umana e Biologia Applicata, Università di Pisa, Italia

****Dipartimento di Chirurgia, Anatomia Patologica III, Università di Pisa, Italia

Colorectal cancer: Tissutal explantation and primary cell culture

BACKGROUND: *Setting of cellular cultures extracted from colorectal cancer tissue represents a valid model for in vitro study of biological and molecular characteristics of each single tumor finalized to obtain a tailored chemotherapy. The end point of this study is to create primary cellular cultures from "fresh" cancer tissue in different stages of evolution.*

METHODS: *Cancer tissue samples are obtained by means of surgical excisional biopsy or by means of semi-automatic biopsy instrument (Sprig-Cut®). After having compared different approaches, two experimental protocols have been selected to have the highest number of intact cells: enzymatic digestion with trypsin and explantation.*

RESULTS AND CONCLUSIONS: *Primary cell culture free of microbic contamination, obtained mainly by means of Spring-Cut® methods, underwent immunohistochemical analysis to evaluate what kind of cell have been grown in vitro by measuring the expression of CK20 and GFAP, both resulted positive.*

The possibility of setting a primary cell culture which represents the cancer of each patient allows a pharmacologic and biomolecular study which can contribute to the development of a tailored adjuvant therapy with many advantages for the patient in terms of positive answer to the treatment and reduced toxicity.

KEY WORDS: Colon cancer, Primary cell culture.

Introduzione

Il trattamento del tumore colo-rettale consiste nella completa exeresi del tumore, del mesocolon e dei linfonodi regionali, con il quale oggi giungono a guarigione il 50-60 % dei pazienti trattati. Recidive e metastasi a distanza si attestano rispettivamente sul 35-38% della popolazione superstite e sul 25-35% in caso di metastasi epatiche. La terapia adiuvante postoperatoria può offrire ai pazienti operati allo stadio III sopravvivenze a 5 anni del

55% rispetto al 40% della sola chirurgia, ed anche nella malattia metastatica, con i nuovi farmaci, si può avere un ridotto rischio di recidiva a 3 anni del 23%. Chemioterapia più chirurgia del tumore primitivo, più chirurgia delle metastasi hanno consentito un prolungamento della sopravvivenza in questi pazienti.

L'impiego di tecniche innovative nell'analisi molecolare e nella diagnostica isto-patologica delle neoplasie ha consentito di identificare e caratterizzare anche nel campo dei tumori gastro-intestinali elementi genetici che consentono di definire nuovi parametri diagnostico-classificativi. Essendo il tumore del colon-retto una malattia genetica multifattoriale^{1,2,3}, la caratterizzazione delle alterazioni molecolari in grado di influenzare l'attività dei farmaci antineoplastici sarebbe altamente auspicabile per giungere all'impiego di farmaci e fattori biologici specifici. Lo studio del profilo genico e dei polimorfismi, l'analisi citogenetica e delle anomalie cromosomiche rap-

Pervenuto in Redazione Maggio 2009. Accettato per la pubblicazione Giugno 2009.

Per corrispondenza: Prof. Roberto Spisni, Università di Pisa, Dipartimento di Chirurgia, Via Roma 67, 56126 Pisa, Italia (e-mail: r.spisni@dc.med.unipi.it).

presentano un valido supporto nel suggerire protocolli diagnostici differenziati in pazienti con tumori apparentemente identici per istotipo e grado di atipia, che non sempre rispondono in ugual modo allo stesso tipo di trattamento chemioterapico.

L'allestimento di colture cellulari da tessuto tumorale del colon si presenta come un valido modello per studiare in vitro l'espressione e il polimorfismo genetico di determinanti molecolari responsabili di sensibilità, resistenza o tossicità al trattamento con farmaci antitumorali. Inoltre può consentire di identificare e validare criteri farmacogenetici per l'individuazione della chemioterapia. L'allestimento di colture umane primarie da tessuto tumorale colico "fresco" (la cui processazione non supera le 24 ore) è però procedura di estrema difficoltà tecnica⁴. Gli esperimenti effettuati nella maggior parte dei laboratori sono ottenuti da colture di linee cellulari tumorali, ma solo le colture primarie di colonociti tumorali riflettono l'effettiva risposta del tumore nei suoi diversi stadi evolutivi agli agenti anti-tumorali^{5,6}.

Una procedura per ottenere colture primarie da tessuto tumorale fresco del colon a diversi stadi di avanzamento della neoplasia è stata messa a punto attraverso la comparazione di diversi approcci metodologici, e pubblicata in un precedente lavoro⁷. Qui riportiamo la tecnica perfezionata con un nuovo metodo di espianto di tessuto tumorale dal colon-retto.

Materiali e metodi

Lo studio ha sede presso il laboratorio di immunologia della Clinica Pediatrica I dell'Università di Pisa. Il campione di tessuto tumorale viene prelevato presso il Dipartimento di Chirurgia (Unità Operativa di Chirurgia 2) dell'Università di Pisa da 18 pazienti affetti da adenocarcinoma del colon e sottoposti ad intervento di chirurgia curativa (maschi n 12, femmine n 6, età 59-87 anni).

Viene privilegiato il campione proveniente da adenocarcinomi a più alto stadio di avanzamento della neoplasia (T3, T4 secondo la classificazione TNM) che, essendo maggiormente infiltrante nella sottomucosa, consente di escludere la mucosa spesso oggetto di contaminazione. La determinazione dello stadio caratterizzante la neoplasia viene effettuata presso l'Unità Operativa di Anatomia e Istologia Patologica, attraverso l'esame istopatologico completo del pezzo operatorio asportato durante exeresi chirurgica.

Dopo resezione colo-rettale, il segmento intestinale, identificato topograficamente è aperto in senso longitudinale e lavato ripetutamente con soluzione fisiologica sterile al fine di allontanare il materiale fecale eventualmente presente (Fig 1-A).

Il prelievo è effettuato nella porzione di tessuto tumorale infiltrante la sottomucosa, distante da tessuto necrotico.

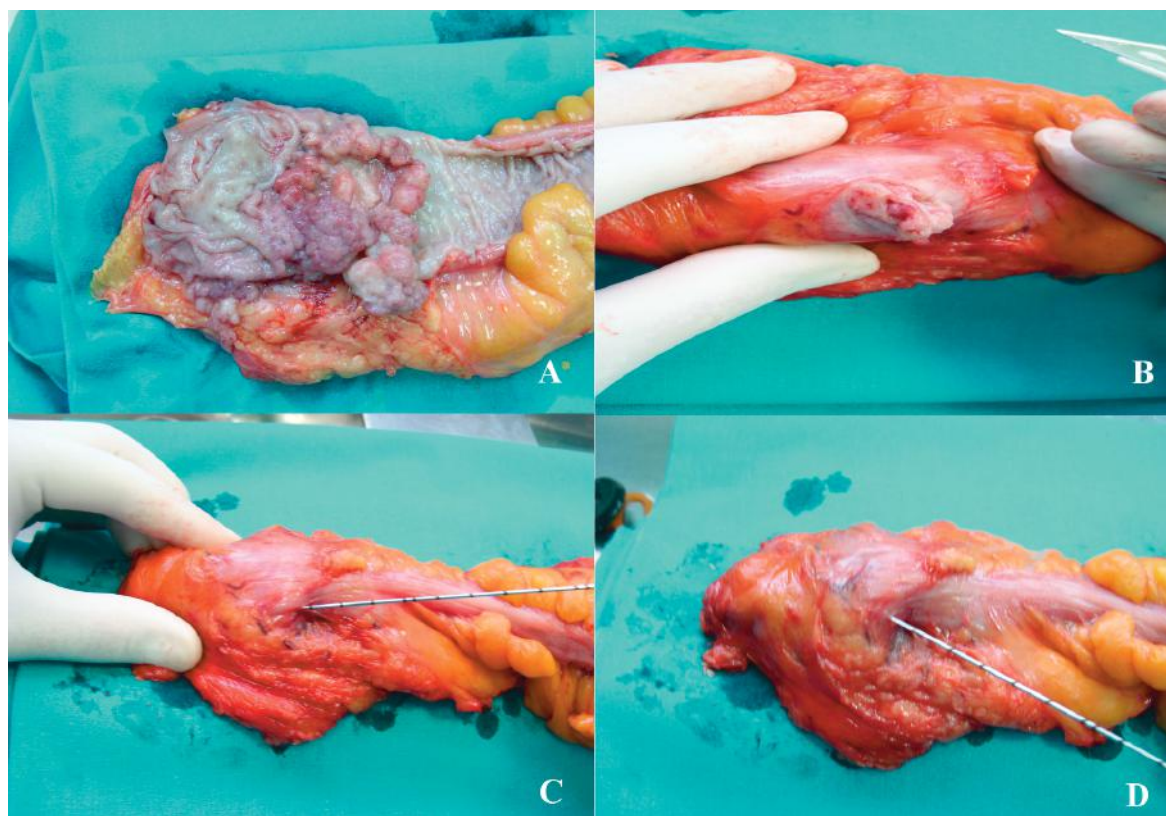


Fig. 1: Tecniche chirurgiche di biopsia incisionale. Sezione longitudinale del segmento intestinale post-resezione (A); biopsia incisionale a cuneo (B); biopsia incisionale con Spring-Cut® (C,D).

Viene posta particolare attenzione nel salvaguardare il margine tumorale, la cui integrità è necessaria al fine della diagnosi istopatologica, soprattutto nelle lesioni di minore diametro.

BIOPSIA INCISIONALE A CUNEO

Al fine di ottenere il materiale tissutale da esaminare è stata utilizzata la tecnica di biopsia incisionale chirurgica, che consente di asportare il frammento desiderato della lesione da esaminare. Si esegue con il bisturi un'incisione cuneiforme per il prelievo della neoplasia (Fig 1-B). È importante che la sezione tissutale ottenuta sia sufficientemente spessa e profonda da includere lo strato sottomucoso, in modo da essere il più possibile rappresentativa di tessuto incontaminato.

La scelta della sede della biopsia deve seguire l'esatta disposizione topografica della lesione stessa, e criteri chirurgici oncologici, al fine di evitare prelievi in aree necrotiche o non rappresentative. In parallelo è opportuno eseguire la biopsia anche sul margine di tessuto sano.

BIOPSIA INCISIONALE CON SPRING-CUT®

Una tecnica alternativa consiste nell'effettuare la bio-

psia con l'uso di uno strumento semiautomatico tranciante per biopsia (Spring-Cut®) che consente di ottenere un frustolo cilindrico di tessuto tumorale mediante introduzione di un apposito ago nel tessuto in esame (Fig 1-C,D).

In caso di neoformazioni di grosse dimensioni è importante campionare più punti cercando di evitare le aree necrotiche o emorragiche.

Tutte le lesioni asportate o i frustoli corrispondenti a biopsie vengono inviati al laboratorio di immunologia immersi in una soluzione precedentemente preparata costituita da terreno RPMI-1640 antibiotato 5X (penicillina-streptomina-gentamicina alle concentrazioni di 500 UI/ml, 500 µg/ml e 100 Ìg/ml rispettivamente; amfotericina B e metronidazolo alla concentrazione di 12,5 µg/ml e 5 µg/ml).

L'esposizione a una soluzione antibiotata concentrata è utile al fine di evitare l'inquinamento microbico del campione. Poiché in una neoplasia solida le cellule neoplastiche sono frammiste a quelle di sostegno, strettamente adese ad una matrice fibrosa, è necessario isolare sterilmente le cellule tumorali per consentire la loro divisione in vitro. Le componenti emorragiche, adipose e necrotiche devono essere eliminate.

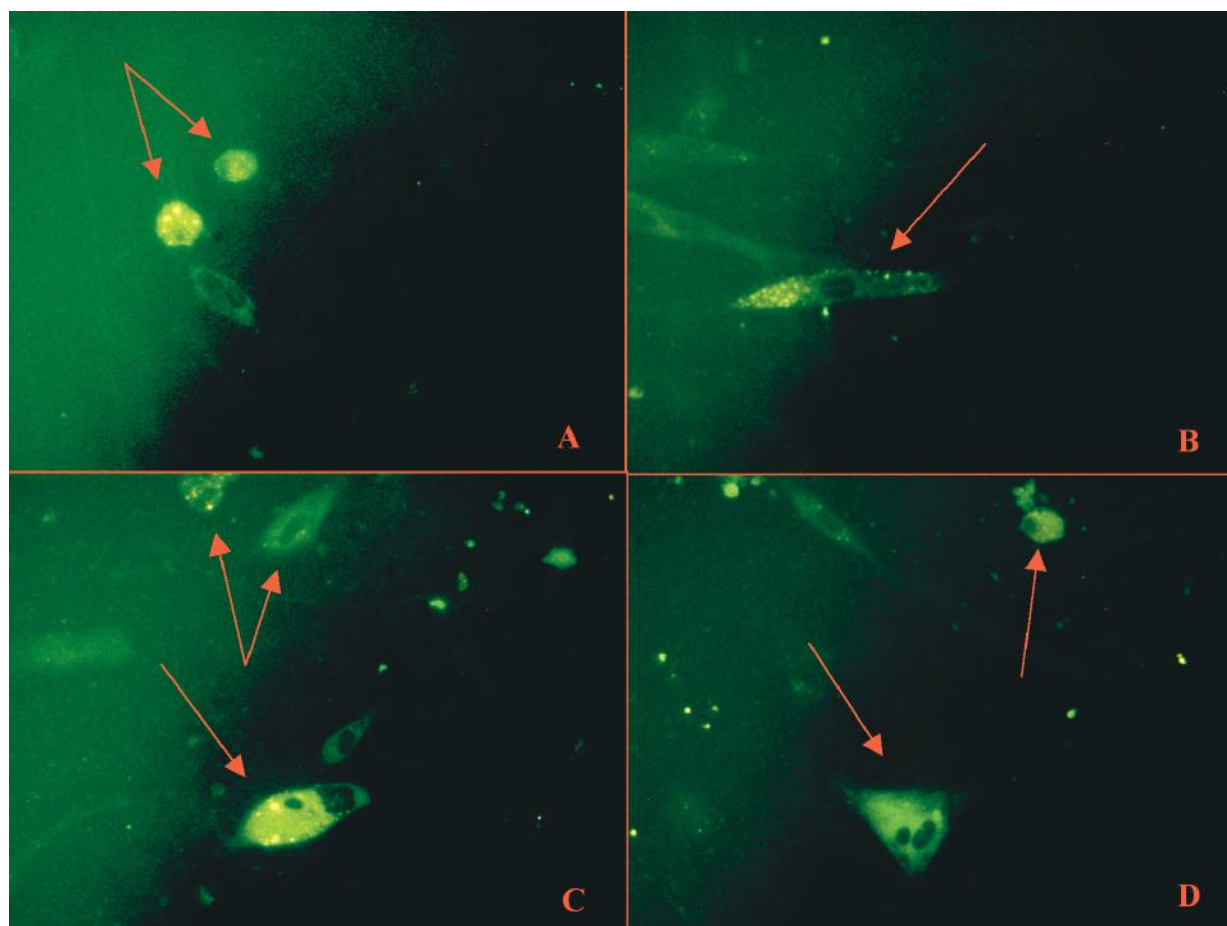


Fig. 2: Colorazione immunohistochemica delle cellule ottenute dalle colture primarie allestite. In figura è stata marcata con la fluorescenza la citocheratina CK20: le frecce indicano le cellule positive alla colorazione.

Dissociazione del campione e isolamento delle cellule

Una volta pervenuto in laboratorio, il pezzo tumorale viene lavato con soluzione fisiologica in condizioni di sterilità; il tessuto è poi finemente tagliato (frammenti tissutali di 0,5-2,0 mm³) con strumenti adatti per causare il minimo danno possibile.

DIGESTIONE CON TRIPSINA A 37°C, IN AGITAZIONE

Dopo disaggregazione meccanica del campione tumorale, i frammenti ottenuti sono sospesi in circa 20-30 ml di tripsina-EDTA 1X pre-riscaldata a 37°C all'interno di una falcon da 50 ml sterile, all'interno di un agitatore (Grant, Boekel). La sospensione è tenuta in agitazione continua per un periodo di tempo variabile da 90 minuti ad 1 ora e 50 minuti.

L'avvenuta digestione enzimatica è controllata mediante visione al microscopio invertito di un'aliquota della sospensione.

La sospensione è quindi filtrata su doppio strato di garza e lavata con terreno contenente siero fetale bovino al fine di inattivare la tripsina⁸.

Successivamente viene effettuato un lavaggio con terre-

no privo di siero e la sospensione cellulare è sottoposta a conta cellulare con il metodo di esclusione mediante il colorante Trypan-Blue.

La sospensione cellulare è portata alla concentrazione finale di 2x10⁵ cellule/ml.

SEMINA CON IL METODO DELL'ESPIANTO

La tecnica dell'espianto primario prevede l'utilizzo di piccole quantità di tessuto. Frammenti di tessuto tumorale delle dimensioni di circa 0,5 mm sono posti in piastre da colture primarie e ricoperti da una piccola quantità di terreno di coltura, al fine di favorire l'adesione delle cellule alla piastra e indurne successivamente la crescita in monostrato.

Ogni 3-4 giorni viene effettuato il cambio del terreno che è aspirato, filtrato mediante filtri sterili con pori di 0,2 µm, addizionato di un uguale volume di terreno fresco e re-introdotta nei pozzetti per non privare le cellule dei fattori di adesione prodotti durante la crescita tissutale⁹.

Il metodo dell'espianto presenta due importanti svantaggi: la scarsa adesività tissutale alla plastica con conseguente minore possibilità di crescita cellulare in monostrato (cui si può ovviare mediante pretrattamento del

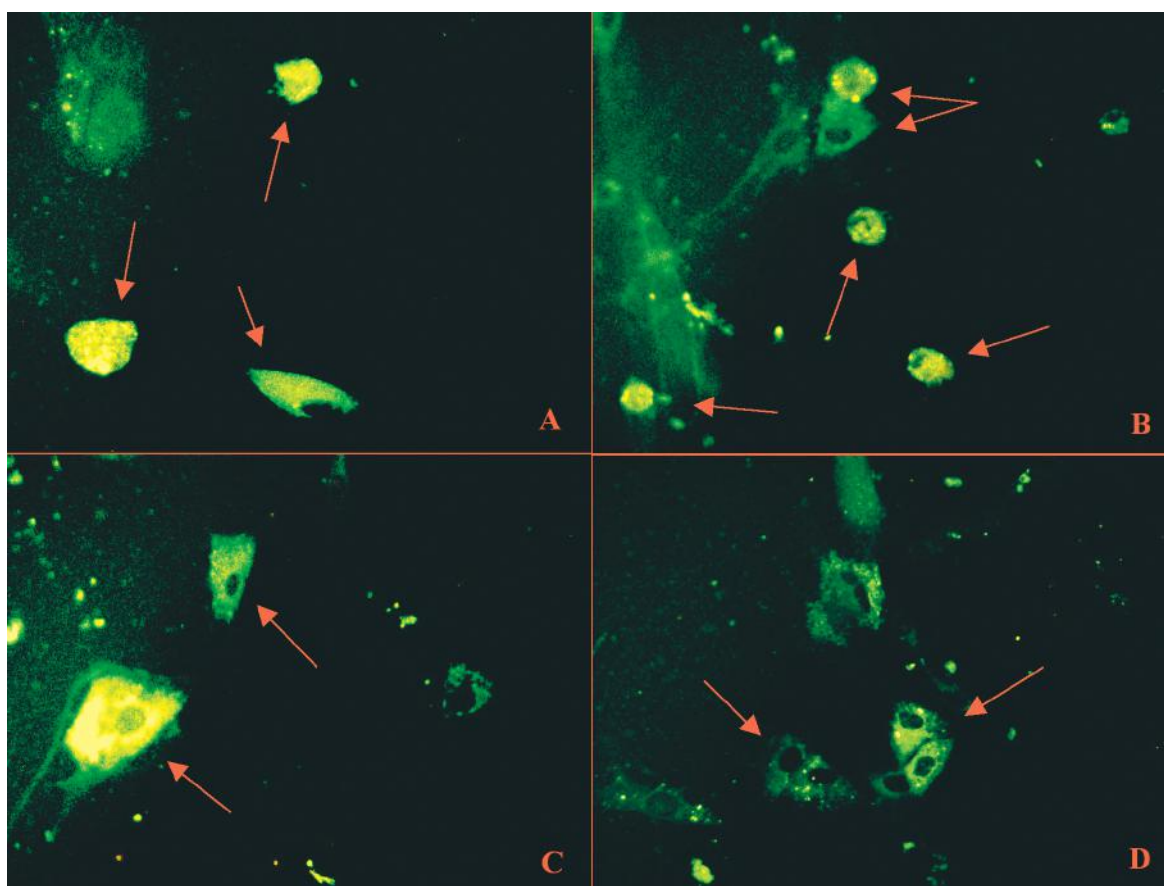


Fig. 3: Colorazione immunostochimica delle cellule ottenute dalle colture primarie allestite. In figura è stata marcata con la fluorescenza la GFAP: le frecce indicano le cellule positive alla colorazione.

supporto plastico con polilissina e fibronectina) e la crescita selettiva delle componenti cellulari del microambiente.

La sospensione cellulare ottenuta viene trasferita in piastre da coltura primaria (Becton-Dickinson).

COLORAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA

L'immunoistochimica è una tecnica che consente l'identificazione e la localizzazione cellulare di proteine, grazie all'uso di anticorpi specifici, riconosciuti a loro volta da anticorpi secondari coniugati a molecole fluorescenti o a enzimi. Per evidenziare l'espressione della citocheratina 20 (CK20) e della proteina acida glio-fibrillare (GFAP), le cellule recuperate dalle colture primarie del colon mediante trattamento con tripsina-EDTA 0,1%, sono state seminate su chamber-slide a 8 pozzetti, che ne permette sia l'osservazione al microscopio ottico che la colorazione. Le cellule sono successivamente fissate con formaldeide 4% per 10 minuti.

Dopo ripetuti lavaggi con PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,1 M, il vetrino viene pre-incubato con PBS 0,1 M contenente il 3% di siero di capra e lo 0,3% di Triton X-100 per 2 ore a temperatura ambiente, e successivamente con l'anticorpo primario a 4°C over-night. Per valutare l'espressione della CK20 e del GFAP sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anticorpo monoclonale anti-citocheratina 20 prediluito, e anticorpo policlonale anti-GFAP prediluito (Ventana Medical System).

Il vetrino viene quindi lavato con PBS 0,1 M e incubato con IgG anti-mouse coniugate con FITC (fluorescein isothiocyanate) (Vector Laboratories, 1:100) per 60 minuti; successivamente viene lavato con PBS 0,1 M, montato con glicerolo e analizzato con il microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse 80I) con una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm.

Risultati e Discussione

Le colture cellulari vengono usate nell'ambito della biologia cellulare per studi di tipo funzionale e per studi di regolazione e funzionamento di proteine e geni; per studiare i meccanismi di crescita, metabolismo e differenziamento cellulare. Nel campo della biologia molecolare le cellule tumorali possono essere usate per l'estrazione di acidi nucleici (RNA e DNA), per la purificazione di proteine, per studi di espressione genica ed analisi dell'effetto delle mutazioni genetiche¹⁰. Esse consentono inoltre lo studio dell'attività biologica di oncogeni, della risposta immunitaria verso antigeni ambientali o antigeni espressi da cellule trasformate.

Le colture cellulari presentano dei vantaggi e degli svantaggi. I vantaggi sono rappresentati dalla semplicità e riproducibilità dei sistemi che consentono di analizzare meccanismi sia cellulari che molecolari. Nella coltura in vitro non vengono abolite le interazioni intercellulari:

persiste infatti la capacità di cooperazione metabolica intercellulare, mediante la quale le cellule secernono fattori di crescita in grado di stimolare reciprocamente la divisione cellulare e di indurre o reprimere la sintesi di specifiche proteine.

Il mantenimento della sterilità nelle colture primarie, le modificazioni genetiche, e la senescenza cellulare costituiscono i principali svantaggi.

Tutte le manipolazioni delle cellule devono pertanto essere effettuate in condizioni di sterilità, per limitare la contaminazione occasionale. I mezzi di coltura, infatti, possono facilmente essere contaminati da batteri, lieviti e funghi che possono inquinare le colture cellulari. Un problema che ha reso difficili i tentativi di allestimento delle colture cellulari è stata l'elevata contaminazione batterica presente nel tessuto in esame, che non ha consentito per alcuni campioni l'ottenimento della coltura.

Il confronto tra la tecnica di biopsia incisionale a cuneo e quella con Spring-Cut[®] utilizzate per il prelievo del tessuto tumorale, ha evidenziato come il secondo metodo risulti più idoneo per fornire un campione adeguato privo di contaminazione, in quanto il frustolo tissutale viene prelevato sterilmente ed è consentito, inoltre, un'escursione bioptica predeterminabile (5-12-20 mm) con adeguamento dimensionale alla lesione e possibilità di prelievo multiplo. La tecnica di biopsia incisionale a cuneo in molti campioni testati, non ha consentito l'appropriata bonifica e quindi il successivo allestimento della coltura primaria; diversamente, l'uso della tecnica di biopsia incisionale con Spring-Cut[®] ha sempre permesso il successivo allestimento delle colture.

Le cellule mantenute in coltura tendono a mutare nel tempo; l'origine di questi cambiamenti fenotipici è sostenuta da modificazioni genetiche (mutazioni, perdita di cromosomi) ed epigenetiche (metilazione del DNA; etc)¹¹. Le cellule derivate dalla dissociazione di tessuti hanno una limitata capacità replicativa e tendono a diventare senescenti; diversamente le linee cellulari che sono in grado di replicarsi indefinitamente in coltura costituiscono un valido modello sperimentale, con il limite tuttavia di rappresentare solo le caratteristiche biologiche di un singolo stadio del tumore in progressione¹⁰. Esse pertanto non possono sostituire il tessuto tumorale fresco negli studi volti alla identificazione della risposta agli agenti anti-tumorali in determinati stadi di sviluppo e progressione tumorale.

Per ottenere la dissociazione del tessuto tumorale e l'isolamento delle cellule mediante digestione enzimatica è stato scelto il metodo che prevede l'utilizzo di tripsina-EDTA 1X a 37°C in agitazione in quanto ha consentito sia il migliore recupero cellulare che un'elevata vitalità (50-60% di cellule vitali), rispetto alla digestione classica con collagenasi (minore del 50%)⁷.

La tecnica dell'espianto ha dato risultati comparabili alla digestione enzimatica con tripsina-EDTA 1X, consentendo l'allestimento di colture cellulari vitali nel tempo. Il pattern citocheratinico espresso dai tessuti normali si

modifica nel momento in cui vanno incontro a trasformazione maligna.

I tessuti patologici risultano positivi a determinate citocheratine; la loro utilità diagnostica è mirata in ambito neoplastico alla caratterizzazione dei carcinomi e dei tumori di natura epiteliale.

L'anti-citocheratina 20 è un anticorpo monoclonale che reagisce principalmente con gli epitelii gastrico ed intestinale, con l'urotelio e con le cellule di Merkel.

La proteina GFAP è una proteina filamentosa intracitoplasmatica che costituisce una porzione del citoscheletro negli astrociti ed è considerata il marcatore più specifico per le cellule di origine astrocitaria. È possibile dimostrare la presenza della proteina GFAP, oltre che nel SNC, nelle cellule gliali enteriche, nelle neoplasie della ghiandola salivare e nei carcinomi renali metastatizzanti.

L'analisi immunohistochimica eseguita sulle cellule delle colture primarie allestite ha evidenziato l'espressione positiva della CK20 e del GFAP (Fig. 2,3).

La positività alla colorazione con l'anti-CK20 conferma la natura epiteliale tumorale delle cellule coltivate, mentre la marcatura eseguita con l'anticorpo anti-GFAP potrebbe indicare l'eventuale inclusione nel prelievo biptico di cellule gliali enteriche.

Conclusioni

Si ritiene che lo studio farmacologico e biomolecolare sulle colture primarie, finalizzato ad un trattamento personalizzato del tumore, possa contribuire notevolmente ad un netto miglioramento dei risultati in termini di risposte obiettive e prolungamento di sopravvivenza. È noto che la sopravvivenza globale a 5 anni di pazienti operati per Carcinoma del colon-retto si situa tra il 50 e il 60%. Numerosi sono i fattori prognostici che secondo i diversi studi condizionano i risultati a distanza, ma di gran lunga i più importanti sono quelli anatomo-patologici e biomolecolari, per cui esiste una stretta correlazione tra stadio della neoplasia e sopravvivenza¹².

Questo contributo vuole sottolineare come la possibilità di allestire una coltura primaria che caratterizzi la neoplasia del singolo paziente possa contribuire allo sviluppo di una terapia adiuvante personalizzata, ma anche evidenziare come il compito del chirurgo sia non solo quello di conoscere le più moderne ed innovative tecniche e strategie chirurgiche, ma anche quello di interagire con i colleghi biologi, anatomo-patologi ed oncologi, al fine di inserirsi in un piano terapeutico che abbia nella collegialità e multidisciplinarietà il proprio punto di forza.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Prof. P. Iaconi per il contributo scientifico apportato a questo lavoro.

Riassunto

Il trattamento chirurgico del carcinoma del colon-retto (CCR) consiste nell'asportazione di tutta la neoplasia macroscopicamente visibile con margine sano, evitando al massimo la disseminazione delle cellule neoplastiche, sia direttamente dal tumore, che per apertura dei vasi linfatici ed ematici; l'estensione del margine sano varia in rapporto al tipo istologico della neoplasia e alla sede della stessa.

I prelievi del tessuto tumorale proveniente da adenocarcinoma (T3, T4 secondo la classificazione TNM) sono ottenuti utilizzando la tecnica di biopsia incisionale chirurgica a cuneo o con l'utilizzo di uno strumento semiautomatico tranciante per biopsia (Spring-Cut®).

Il prelievo del tessuto identificato topograficamente viene effettuato nella sottomucosa, lontano da focolai necrotici ed emorragici, ponendo particolare attenzione nel salvaguardare il margine tumorale al fine della diagnosi istopatologica.

Attraverso la comparazione di diversi approcci metodologici, sono stati selezionati due protocolli sperimentali che consentono di ottenere un elevato recupero cellulare: la digestione enzimatica con tripsina e il metodo dell'espianto.

Il prelievo tissutale attraverso biopsia incisionale con Spring-Cut® ha permesso di limitare notevolmente la contaminazione microbica, che costituisce il principale ostacolo all'allestimento delle colture primarie da colon. L'analisi immunohistochimica, effettuata valutando l'espressione della CK20 e del GFAP, ha confermato la natura epiteliale tumorale delle cellule in coltura, e la presenza di cellule del sistema gliale enterico incluse nel prelievo biptico.

L'allestimento di colture cellulari da tessuto tumorale del colon-retto può rappresentare un valido modello per studi farmacologici e biomolecolari in vitro su singolo tumore, contribuendo allo sviluppo di una terapia adiuvante personalizzata, con possibili vantaggi per il paziente sia in termini di risposta al trattamento, che in termini di tossicità.

Bibliografia

- 1) Hanahan D, Weinberg RA: *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000; 100(1):57-70.
- 2) Grady WM, Carethers JM: *Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis*. Gastroenterology, 2008; 135(4): 1079-99.
- 3) Fearon ER, Vogelstein B: *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990; 61: 759-67.
- 4) Dangles-Marie V, Pocard M, Richon S, e coll: *Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: Comparison of success rate and cell line features*. Cancer Res, 2007; 67: 398-407.

- 5) Luca T, Privitera G, Lo Monaco M, e coll: *Validation study of a cell culture model of colorectal cancer*. Ital J Anat Embryol, 2007; 112: 81-92.
- 6) Leow CC, Polakis P, Gao WQ: *A role for Hath 1, a bHLH transcription factor, in colon adenocarcinoma*. Ann N Y Acad Sci, 2005; 1059: 174-83.
- 7) Failli A, Consolini R, Legitimo A, et al.: *The challenge of culturing human tumoral colorectal cells: establishment of a cell culture model by the comparison of different methodological approaches*. Tumori, in press.
- 8) Freshney RI: *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. New York: Wiley-Liss ed, 1987.
- 9) Paul J: *Cell and tissue culture*. Edimburgh- London- New York: Churchill Livingstone ed, 1975.
- 10) Oikonomou E, Kothonidis K, Zografos G, et al.: *Newly established tumorigenic primary human colon cancer cell lines are sensitive to TRAIL-induced apoptosis in vitro and in vivo*. Br J Cancer, 2007; 97:73-84.
- 11) Rossman TG, Goncharova EI, Nádas A: *Modeling and measurement of the spontaneous mutation rate in mammalian cells*. Mutat Res, 1995; 328(1):21-30.
- 12) Bellantone R, De Toma G, Montorsi M: *Chirurgia Generale*. Torino: Minerva Medica ed, 2009.

